

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle**
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
15 septembre 2005 (15.09.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2005/085329 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ : **C08J 3/24,**
3/075, A61L 27/52, 27/26 // C08L 5:00

AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/000197

(22) Date de dépôt international :
31 janvier 2005 (31.01.2005)

(25) Langue de dépôt : **français**

(26) Langue de publication : **français**

(30) Données relatives à la priorité :
0400987 **3 février 2004 (03.02.2004)** **FR**

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : ANTEIS S.A. [CH/CH]; Chemin des Aux 18, c/o Fondation Genevoise pour l'innovation, Technologique FONGIT, CH-1228 Plan-Les-Ouates, Genève (CH).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : HERMITTE, Laurence [FR/FR]; 19, avenue André Chamson, Résidence St Jean, F-13080 Luynes (FR). BENOIT, Olivier [FR/FR]; 2 bis, rue Paul Guiton, F-74000 Annecy (FR).

(74) Mandataire : COURNARIE, Michèle; Cabinet Loyer, 78, avenue Raymond Poincaré, F-75116 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: BIOCOMPATIBLE CROSSLINKED GEL

(54) Titre : GEL RETICULE BIOCOMPATIBLE

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing a biocompatible crosslinked gel consisting in crosslinking a determined quantity of at least one type of liquid biocompatible polymer by adding a quantity of crosslinking agent, in carrying out a crosslinking reaction, in adding an additional quantity of liquid polymer whose molecular mass is greater than 500,000 Da, in solving the reaction mixture in such a way that the total concentration of the liquid polymer is reduced, in crosslinking and in stopping the crosslinking reaction by removing the crosslinking agent. The inventive gel and the use thereof are also disclosed.

(57) Abrégé : L'invention concerne un procédé de fabrication d'un gel réticulé biocompatible comportant les étapes : d'amorçage de la réticulation d'une quantité déterminée d'au moins un polymère biocompatible en solution par l'ajout d'une quantité d'agent réticulant, de réaction de réticulation de ladite quantité de polymère, d'ajout d'une quantité supplémentaire de polymère de masse moléculaire supérieure à 500 000 Da en solution avec dilution du mélange réactionnel de manière à diminuer la concentration globale du polymère en solution, et de réticulation, et d'arrêt de la réaction de réticulation par élimination de l'agent réticulant ; ainsi que le dit gel et son utilisation.

WO 2005/085329 A1

GEL RETICULE BIOCOMPATIBLE

La présente invention concerne un procédé de fabrication d'un gel réticulé biocompatible, ledit gel et l'utilisation dudit gel pour constituer une matrice comportant au moins un principe actif dispersé ou pour séparer, remplacer ou combler un tissu biologique ou augmenter le volume dudit tissu ou encore supplémenter ou remplacer un fluide biologique.

L'augmentation du volume tissulaire peut être souhaitée à la fois dans le cas d'applications thérapeutiques et dans un but cosmétique. Elle peut être effectuée par introduction d'une solution viscoélastique à base de produits permanents ou biodégradables dans les tissus biologiques.

L'injection de solutions viscoélastiques à base de produits permanents ou biodégradables est également envisagée pour remplacer un fluide biologique.

Par exemple, elle est utilisée pour remplacer le liquide synovial naturel qui, chez les patients arthrosiques, ne peut plus assurer ses fonctions chondroprotectrices, de lubrification et d'absorption des chocs compte tenu d'une réduction de la quantité et de la masse moléculaire des glycosaminoglycans constitutifs. Mais cette solution viscoélastique, lorsqu'elle est constituée à base de produits biodégradables, est rapidement éliminée de la poche synoviale.

Dans le cas d'autres applications thérapeutiques, ce type de solution viscoélastique est utilisé pour certains tissus qui nécessitent d'être élargis pour assurer leur fonction ; il s'agit par exemple des cordes vocales, de l'œsophage, du sphincter ou de l'urètre.

Dans le cas des applications cosmétiques, ce type de solution viscoélastique est utilisé par exemple, pour le comblement des rides, le masquage des cicatrices, ou l'augmentation du volume des lèvres. L'injection de ces solutions viscoélastiques est une méthode simple, non invasive, moins risquée et moins onéreuse que la chirurgie esthétique.

L'utilisation de solution viscoélastique à base de produits permanents présente l'avantage d'une longue rémanence dans les tissus où la solution viscoélastique est injectée.

L'injection de silicone a très longtemps été utilisée. Cependant, compte tenu des effets indésirables à long terme de cette méthode, qui se caractérisent par l'apparition de nodules et d'ulcère de la peau, cette pratique est peu à peu abandonnée.

5 L'injection de microparticules solides en suspension permet également une augmentation du volume tissulaire permanente. Le brevet US 5,344,452 décrit l'utilisation d'un solide pulvérulent, constitué de petites particules, de diamètre compris entre 10 μm et 200 μm , et ayant une surface très lisse. Artecoll® et Arteplast®, produits commercialisés, sont constitués d'une suspension de microsphères de polyméthacrylate dans une solution de collagène. Le brevet EP 1 091 775 propose une suspension de fragments d'hydrogel de méthacrylate dans une solution de hyaluronate. Les particules de silicone, céramiques, de carbone ou métalliques (brevets US 5,451,406, US 5,792,478 et demande US2002151466), et les fragments de polytétrafluoroéthylène, de verre ou de polymères synthétiques 10 (demande US2002025340) ont également été utilisées mais les résultats sont décevants. En effet, des réactions secondaires, issues de la dégradation biologique de 15 la solution de mise en suspension biodégradable et de la migration des fragments résiduels qui peuvent induire une réaction inflammatoire, peuvent survenir. En outre, l'injection de particules au travers d'une aiguille fine peut être difficile si les 20 particules ont une diamètre trop important ou une forme irrégulière qui peut provoquer l'agglutination des particules entre elles. De plus, l'injection de particules fragiles peut endommager leur structure ce qui aboutit à l'injection de particules trop fines qui n'adhèrent pas aux cellules environnantes mais migrent vers d'autres tissus, 25 ou sont rapidement digérées par les macrophages et les autres constituants du système lymphatique.

D'une manière générale, le caractère permanent de ces produits induit des inconvenients majeurs (US 6 436 424) qui sont notamment le risque d'activation des macrophages, la migration des fragments synthétiques constitutifs du produit pouvant provoquer une réaction inflammatoire pouvant même aboutir à l'apparition 30 de granulomes. Le traitement de ces granulomes nécessite alors soit un traitement thérapeutique par injection de stéroïdes soit un traitement chirurgical par excision, ces traitements pouvant avoir des conséquences lourdes sur la santé du patient ou sa

qualité de vie. Par conséquent, les effets secondaires des produits permanents sont si néfastes qu'ils découragent l'utilisation de ces produits dans un but purement esthétique. De plus, l'injection de solution viscoélastique à base de produits permanents ne permet pas de retouche si nécessaire.

5 Parmi les matériaux biologiquement dégradables, il existe des suspensions de collagène ou d'acide hyaluronique réticulé.

Collagen Corporation a développé une préparation à base de collagène réticulé avec du glutaraldéhyde décrite dans le brevet US 4 582 640. Cependant, ce produit est dégradé rapidement au sein du tissu où il est injecté, par les macrophages, 10 ou par action enzymatique ou chimique et est ensuite éliminé du tissu par le système lymphatique. Le brevet US 5 137 875 propose l'utilisation de suspensions ou solutions aqueuses de collagène contenant de l'acide hyaluronique, mais ce produit ne peut constituer un traitement à long terme car il est également rapidement digéré puis éliminé par le système lymphatique. Des traitements répétés sont donc 15 nécessaires ce qui engendre un coût considérable et diminue la qualité de vie du patient.

Le brevet EP 0 466 300 propose l'injection d'un gel viscoélastique biphasique composé d'une matrice dispersée dans une phase liquide, les deux phases étant composées par du hyalan, hyaluronate de haute masse moléculaire d'origine 20 animale, réticulé et extrait. L'utilisation d'un polymère de haute masse moléculaire permet une plus grande rémanence du gel viscoélastique biodégradable dans le tissu. Cette technologie a donné lieu à plusieurs produits sur le marché tels que le Hylaform®, pour le comblement des dépressions de la matrice intercellulaire du tissu conjonctif, ou le Synvisc®, produit de viscosupplémentation pour le traitement de 25 l'arthrose.

Parmi les produits biodégradables biphasiques, peuvent également être cités Restylane®, Macrolane®, Perlane®, ou Durolane®, autres compositions biphasiques constituées d'une phase fluide (hyaluronate non réticulé) et d'une phase composée d'acide hyaluronique très réticulé. Destinés à l'augmentation du volume tissulaire 30 (visage, seins) ou au traitement arthrosique, ces produits sont basés sur la technologie NASHA détenue par Q-Med. Il a été également observé que, dans certains cas, l'utilisation de produits biphasiques pouvait induire des réactions inflammatoires

voire engendrer l'apparition de granulomes (Laeschke K. Biocompatibility of microparticles into soft tissues fillers. Congress of Aesthetic Medicine and Dermatologic Surgery, Paris, 2003) même si ces réactions sont moins observées qu'en présence d'un gel à base de polymères synthétiques. De plus, la phase fluide 5 est très rapidement éliminée, ce qui engendre une perte de matière correspondant au volume de cette phase fluide. Par conséquent, lorsqu'une augmentation du volume tissulaire est recherchée, de nombreuses retouches sont nécessaires après la première injection, ce qui diminue la qualité de vie de l'utilisateur.

Enfin, plusieurs gels viscoélastiques monophasiques ont été proposés soit 10 pour homogénéiser le taux de réticulation au sein du gel (demande de brevet US 20030148995), soit pour contrôler la biodégradabilité du gel (US 4 963 666), soit pour contrôler les propriétés viscoélastiques du gel (US 5 827 937). Une forte réticulation des polymères permet une plus grande rémanence dans le tissu du gel viscoélastique biodégradable. Cependant l'injection du gel comportant un tel 15 polymère fortement réticulé est plus difficile. De plus, l'injection d'un tel gel fragilise mécaniquement les sites non réticulés du polymère qui deviennent plus vulnérables à des attaques biochimiques et enzymatiques, ce qui favorise une dégradation rapide du gel.

L'invention a pour but de proposer un gel réticulé biocompatible qui évite les 20 inconvénients précités, qui présente les avantages simultanés de mise en œuvre facile dans son utilisation clinique et de durée de vie telle que le gel réticulé biocompatible disparaît lorsque sa fonction n'est plus souhaitée, mais suffisante pour limiter le nombre d'administrations par actes médicaux ou chirurgicaux.

A cet effet, l'invention a pour objet un procédé de fabrication d'un gel 25 réticulé biocompatible comportant les étapes :

d'amorçage de la réticulation d'une quantité déterminée d'au moins un polymère biocompatible en solution par l'ajout d'une quantité d'agent réticulant, de réaction de réticulation de ladite quantité de polymère,

d'ajout d'une quantité supplémentaire de polymère de masse moléculaire 30 supérieure à 500 000 Da en solution avec dilution du mélange réactionnel de manière à diminuer la concentration globale du polymère en solution, et de réticulation, et

d'arrêt de la réaction de réticulation par élimination de l'agent réticulant.

L'étape d'ajout d'une quantité supplémentaire de polymère permet l'apport de sites réactionnels nouveaux.

Ce procédé permet d'obtenir un gel réticulé biocompatible présentant 5 simultanément les caractéristiques d'être monophasique, polydensifié, cohésif, injectable et à longue rémanence.

Par cohésif, on entend une tendance du gel à se regrouper et non à se répandre ou se fragmenter. Le caractère cohésif contribue donc à l'obtention d'une compatibilité élevée et d'une longue rémanence *in vivo* du gel.

10 Par polydensifié, on entend une variation du degré de réticulation au sein même du gel. Le caractère polydensifié du gel permet à la composition de cumuler les avantages d'injectabilité au travers d'une aiguille de faible diamètre et de longue rémanence *in vivo* du gel.

15 Le caractère monophasique permet de réduire les risques de réactions inflammatoires et d'apparition de granulomes.

L'effet de longue rémanence du gel permet d'espacer les actes médicaux et donc d'améliorer la qualité de vie des patients.

20 Un tel gel monophasique polydensifié cohésif obtenu suivant le procédé de la présente invention se caractérise par une injectabilité facilitée et une rémanence *in vivo* supérieure à celle d'un gel monophasique de même composition, dont le taux de réticulation est homogène au sein du gel.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, l'étape d'amorçage de la réticulation est réalisée en milieu basique.

25 Selon un autre mode de réalisation de l'invention, l'étape d'amorçage de la réticulation est réalisée en milieu acide.,

Selon une variante de l'invention, une quantité supplémentaire d'agent réticulant est ajoutée lors de l'étape d'ajout d'une quantité supplémentaire de polymère.

Préférentiellement, l'étape d'arrêt de la réticulation est réalisée par dialyse. La dialyse assure l'arrêt final de la réaction. Elle élimine l'agent réticulant et les petites chaînes de polymère n'ayant pas réagi.

Avantageusement, les polymères sont d'origine naturelle. L'utilisation de 5 polymères d'origine naturelle permet une meilleure biocompatibilité c'est-à-dire qu'une telle utilisation engendre moins de risques de réaction inflammatoire.

Préférentiellement, les polymères d'origine naturelle sont des composés choisis dans le groupe constitué par : l'acide hyaluronique, la chondroïtine sulfate, le kératane, le kératane sulfate, l'héparine, l'héparane sulfate, la cellulose et ses dérivés, 10 les alginates, le xanthane, la carraghénine, les protéines ou les acides nucléiques.

De manière encore plus avantageuse, au moins un polymère d'origine naturelle est un polymère non naturellement présent chez l'être humain choisi dans le groupe constitué par : la cellulose et ses dérivés, les alginates, le xanthane, la carraghénine, polymère qui est réticulé avec au moins un polymère naturellement présent chez l'être humain choisi dans le groupe constitué par : l'acide hyaluronique, la chondroïtine sulfate, le kératane, le kératane sulfate, l'héparine, l'héparane sulfate, 15 les protéines ou les acides nucléiques.

Avantageusement, l'agent réticulant est une molécule bi- ou poly-fonctionnelle sélectionnée parmi les composants du groupe constitué par les 20 époxydes, les épihalohydrines et la divinylsulfone.

L'invention a également pour objet un gel préparé par le procédé susmentionné.

De manière préférentielle, le gel constitue une matrice comportant au moins un principe actif dispersé. Le gel sera alors utilisé comme vecteur permettant une 25 libération progressive dudit principe actif au sein du liquide ou du tissu biologique où il a été injecté.

Enfin, l'invention a pour objet l'utilisation de ce gel pour séparer, remplacer ou combler un tissu biologique ou augmenter le volume dudit tissu ou encore supplémenter ou remplacer un fluide biologique.

30 L'invention sera mieux comprise, et d'autres buts, détails, caractéristiques et avantages de celle-ci apparaîtront plus clairement au cours de la description

explicative détaillée qui va suivre, d'un mode de réalisation de l'invention donné à titre d'exemple purement illustratif et non limitatif.

Le procédé de fabrication du gel réticulé biocompatible se caractérise par les étapes successives d'amorçage de la réticulation d'une quantité déterminée d'au moins un polymère biocompatible en solution, de réaction de réticulation de ladite quantité de polymère, d'ajout d'une quantité supplémentaire de polymère de masse moléculaire supérieure à 500 000 Da en solution avec dilution du mélange réactionnel de manière à diminuer la concentration globale du polymère en solution, et de réticulation, et d'arrêt de la réaction de réticulation par élimination de l'agent réticulant.

L'étape d'amorçage de la réticulation est réalisée par l'ajout d'une quantité d'agent réticulant qui est une molécule bi- ou poly-fonctionnelle sélectionnée parmi les composants du groupe constitué par les époxydes, les épihalohydrines et la divinylsulfone. Les époxydes préférés sont les composants choisis dans le groupe constitué par : le 1,4 butanediol diglycidyl éther (aussi appelé 1,4-bis (2,3-époxypropoxy)butane), le 1-(2,3- époxypropyl) 2,3- époxy cyclohexane et le 1,2-éthanediol diglycidyl éther.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, l'étape d'amorçage de la réticulation est réalisée en milieu basique. La réaction de réticulation effectuée en milieu basique se traduit par la formation de liaisons éther qui sont très solides. La réticulation par éthérification permet une plus longue rémanence *in vivo*.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, l'étape d'amorçage de la réticulation est réalisée en milieu acide. La réaction de réticulation effectuée en milieu acide se traduit par la formation de liaisons ester qui sont plus labiles que les liaisons éther précédemment citées. Cependant une plus grande labilité des pontages peut présenter certains avantages. Notamment, un tel gel utilisé comme matrice comportant un principe actif dispersé permet une autre cinétique de libération dudit principe actif plus adaptée à certaines applications.

La réaction de réticulation est la réaction qui assure le pontage des chaînes de chaque polymère entre eux. Elle peut être quantifiée par la détermination du taux de réticulation.

Le taux de réticulation est défini comme le rapport entre le nombre de moles d'agent réticulant assurant le pontage des chaînes de chaque polymère et le nombre de moles de motifs du polymère.

La réticulation s'effectue dans une plage de températures préférentielles de
5 25°C à 60°C.

La réticulation peut s'effectuer sur un même polymère ou sur un mélange de polymères.

Les polymères engagés dans la réaction de réticulation peuvent être synthétiques mais sont avantageusement d'origine naturelle. L'utilisation de
10 polymères d'origine naturelle permet une meilleure biocompatibilité, c'est-à-dire qu'une telle utilisation engendre moins de risques de réaction inflammatoire.

Préférentiellement, on utilise les polymères d'origine naturelle susmentionnés.

Il est cependant bien évident que l'invention ne se limite pas aux polymères
15 susmentionnées mais peut utiliser des polymères de nature et de taille différente.

L'étape d'ajout d'une quantité supplémentaire de polymère s'accompagne d'une dilution du milieu réactionnel de sorte que la concentration totale en polymère de la solution diminue.

Dans ces conditions, les chaînes de polymère apportant des sites de
20 réticulation nouveaux vont réagir avec l'agent de réticulation résiduel et/ou ajouté en faible quantité, en se fixant sur le gel réticulé initial et entre elles avec un plus faible taux de réticulation puisque la quantité d'agent de réticulation a diminué. Le nombre de pontages sur les chaînes de gel formé dans la première étape de réticulation est supérieur au nombre de pontages entre celui-ci et les chaînes ajoutées et au nombre de pontages entre les chaînes ajoutées. Le degré de réticulation varie donc au sein du gel final qui est constitué de noyaux fortement réticulés (par exemple avec un taux de réticulation de 25%) reliés entre eux par un gel de moins en moins réticulé (dont le taux de réticulation diminue progressivement et peut atteindre 1%). Cette particularité lui confère propriétés viscoélastiques exceptionnelles qui permettent au
25 gel, tout en présentant un taux de réticulation important et donc une longue
30

rémanence *in vivo*, d'être cohésif (un seul et même gel) et injectable par toute sorte de dispositifs médicaux et notamment les aiguilles fines.

L'ajout de polymères supplémentaires s'effectue à tout niveau d'avancement de la réaction de réticulation initiale, avantagusement à 75% de la réaction de réticulation initiale. Cette étape peut être effectuée par apport de polymère de façon continue ou discontinue.

Les polymères supplémentaires doivent présenter une masse moléculaire supérieure à 500 000 Da. Ils peuvent également être synthétiques ou naturels. Ils peuvent être ajoutés sous forme de mélange de polymères. Ils peuvent être de nature ou de taille identique ou différente de ceux utilisés dans l'étape de réticulation initiale. De manière avantageuse, les polymères supplémentaires ajoutés sont constitués de plus longues chaînes que les polymères présents initialement. Ceci confère au gel une amélioration de sa structure mécanique externe, les longues chaînes étant plus difficilement dégradées que les courtes.

Ce procédé permet par conséquent d'obtenir un gel réticulé biocompatible présentant simultanément les caractéristiques d'être monophasique, polydensifié, cohésif, injectable et à longue rémanence.

Selon un certain mode de réalisation de l'invention, une quantité supplémentaire d'agent réticulant est ajoutée lors de l'étape d'ajout d'une quantité supplémentaire de polymère. Cet agent de réticulation pourra être de nature identique ou différente à celle de celui utilisé lors de la réaction d'amorçage de la réaction. Il est préférentiellement choisi parmi les composants du groupe susmentionné. La quantité ajoutée est nettement inférieure à la quantité ajoutée pour la réticulation initiale.

L'étape d'arrêt de la réaction de réticulation assure l'arrêt final de la réaction. Elle est par exemple réalisée par dialyse qui permet d'éliminer l'agent réticulant et les petites chaînes de polymère n'ayant pas réagi. En effet l'injection d'un gel comportant un tel agent induit des réactions inflammatoires car ces agents sont des composants chimiques difficilement assimilables et très réactifs.

De manière préférentielle, le gel constitue une matrice comportant au moins un principe actif dispersé. Le gel est alors utilisé comme vecteur permettant une

libération progressive dudit principe actif au sein du liquide ou du tissu biologique où il a été injecté. Le principe actif est un agent pharmacologiquement actif pouvant être par exemple un agent anti-oxydant. Le principe actif peut également être de nature différente. Un mélange de principes actifs de nature différente peut également être 5 dispersé dans le gel.

Ce gel est préférablement injecté.

Enfin, le gel est avantageusement utilisé pour séparer, remplacer ou combler un tissu biologique ou augmenter le volume dudit tissu par exemple dans le cas d'applications thérapeutiques (augmentation du volume des cordes vocales, de 10 l'œsophage, du sphincter, de l'urètre ou d'autres organes) ou dans un but cosmétique pour le comblement des rides, le masquage des cicatrices, ou l'augmentation du volume des lèvres.

Il peut également supplémenter ou remplacer un fluide biologique, par exemple le liquide synovial naturel.

15 Des exemples sont proposés afin d'illustrer l'invention mais ne sont nullement limitatifs de l'invention.

Exemple 1 (comparatif)

20 10 g d'acide hyaluronique ($MM=2\times 10^6$ Da) sont dilués dans 100 ml d'une solution de NaOH à 1%. L'acide hyaluronique est hydraté par cette étape préalable à la réticulation.

Le tout est homogénéisé dans un mélangeur jusqu'à ce qu'une solution transparente soit obtenue.

25 La réaction de réticulation est alors amorcée par ajout de 470 µl de 1,4-butanediol diglycidyl éther (BDDE) à la solution et le tout est mélangé pendant 15 h à 25°C, dans une atmosphère privée d'oxygène.

Le pH est réajusté au pH physiologique à l'aide d'HCl 1M. Le volume est ajusté à 400 ml à l'aide d'une solution tamponnée à pH=7.

Le gel obtenu est ensuite dialysé pendant 24 h (cellulose régénérée, limite de séparation : MM=60 kDa) contre une solution tamponnée à pH=7 (Gel I).

Ce gel a une teneur en acide hyaluronique totale de 2,5% en masse.

5

Exemple 2 (comparatif)

Le gel est ici réalisé de la même manière que dans l'exemple 1 sauf qu'un quantité plus importante d'agent réticulant est ajoutée.

10 g d'acide hyaluronique (MM=2x10⁶Da) sont dilués dans 100 ml d'une solution de NaOH à 1%.

Le tout est homogénéisé dans un mélangeur jusqu'à ce qu'une solution transparente soit obtenue.

15 760 µl de 1,4-butanediol diglycidyl éther (BDDE) sont ensuite ajoutés à la solution et le tout est mélangé pendant 15 h à 25°C, dans une atmosphère privée d'oxygène.

Le pH est réajusté au pH physiologique à l'aide d'HCl 1M.

Le volume est ajusté à 400 ml à l'aide d'une solution tamponnée à pH=7.

Le gel obtenu est ensuite dialysé pendant 24 h (cellulose régénérée, limite de séparation : MM=60 kDa) contre une solution tamponnée à pH=7 (Gel II).

20 Ce gel a une teneur en acide hyaluronique totale de 2,5% en masse.

Exemple 3 (comparatif)

25 Le gel est ici réalisé de la même manière que dans les exemples 1 ou 2 sauf qu'un quantité encore plus importante d'agent réticulant est ajoutée.

10 g d'acide hyaluronique (MM=2x10⁶Da) sont dilués dans 100 ml d'une solution de NaOH à 1%.

Le tout est homogénéisé dans un mélangeur jusqu'à ce qu'une solution transparente soit obtenue.

950 µl de 1,4-butanediol diglycidyl éther (BDDE) sont ensuite ajoutés à la solution et le tout est mélangé pendant 15 h à 25°C, dans une atmosphère privée
5 d'oxygène.

Le pH est réajusté au pH physiologique à l'aide d'HCl 1M.

Le volume est ajusté à 400 ml à l'aide d'une solution tamponnée à pH=7 et l'ensemble est homogénéisé.

Le gel obtenu est ensuite dialysé pendant 24 h (cellulose régénérée, limite de
10 séparation : MM=60 kDa) contre une solution tamponnée à pH=7 (Gel III).

Ce gel a une teneur en acide hyaluronique totale de 2,5% en masse.

Exemple 4 (selon l'invention)

15 10 g d'acide hyaluronique (MM=2x10⁶Da) sont dilués dans 100 ml d'une solution de NaOH à 1%.

Le tout est homogénéisé dans un mélangeur jusqu'à ce qu'une solution transparente soit obtenue.

La réaction de réticulation est amorcée par l'ajout de 950 µl de 1,4-butanediol
20 diglycidyl éther (BDDE) sont ensuite ajoutés à la solution et le tout est mélangé pendant 9 h à 25°C, dans une atmosphère privée d'oxygène.

Puis, un polymère supplémentaire est ajouté tout en ajustant le volume à 300 ml à l'aide d'une solution d'acide hyaluronique 0,5% pH=11 (MM=2x10⁶Da).

La réaction continue encore 6 h. Le pH est réajusté au pH physiologique à
25 l'aide d'HCl 1M et le volume ajusté à 400 ml.

L'ensemble est homogénéisé.

Afin d'arrêter définitivement la réaction de réticulation, le gel obtenu est ensuite dialysé pendant 24 h (cellulose régénérée, limite de séparation : MM=60 kDa) contre une solution tamponnée à pH=7 (Gel IV).

Seul ce dernier gel est réalisé selon l'invention, les trois autres types de gel étant réalisés selon l'état de la technique, c'est-à-dire avec une réticulation uniforme.

Ce gel a une teneur en acide hyaluronique totale de 2,75% en masse.

5 Une étude rhéologique a été réalisée sur les gels présentés dans les exemples 1 à 4.

Cette étude consiste en la mesure de la force limite d'extrusion (F) d'un gel c'est-à-dire la force à partir de laquelle le gel peut être extrudé.

Pour cela, le gel est contenu dans un cylindre en acier inoxydable de 2,5 cm 10 de diamètre et extrudé au travers d'un pore de 0,2mm de diamètre.

Les résultats obtenus sont présentés par le tableau suivant :

Type de gel	F (N/mm ²) σ=0,15N/mm ²
I	3,56
II	5,85
III	7,40
IV	6,12

σ: écart type

15 Les gels I, II et III représentent des gels dont le taux de réticulation est constant dans le gel. Seul le gel IV présente un gel dont le taux de réticulation est variable.

Cette méthode met en évidence tout d'abord qu'un ajout croissant d'agent réticulant (entre les gels de type I à III) se traduit par une force limite d'extrusion également plus importante, c'est-à-dire que la force à appliquer pour extruder un gel 20 à taux de réticulation croissant augmente pour les gels présentant un taux de réticulation homogène.

Le gel de type IV (gel selon l'invention) à 2,75% en masse d'acide hyaluronique s'injecte quasi aussi facilement qu'un gel à 2,5% en masse d'acide

hyaluronique de taux de réticulation plus faible et homogène (gel de type II) et plus facilement (avec une force F 15% plus faible) qu'un gel à 2,5% en masse d'acide hyaluronique dont le taux de réticulation est identique mais homogène (gel de type III).

- 5 Par conséquent, cet exemple prouve qu'un gel selon l'invention, dont le taux de réticulation est hétérogène, permet, à un taux de réticulation important, et donc de rémanence *in vivo* importante, d'être facilement extrudé par des dispositifs de type aiguille fine.

REVENDICATIONS

1. Procédé de fabrication d'un gel réticulé biocompatible comportant les étapes :
 - d'amorçage de la réticulation d'une quantité déterminée d'au moins un polymère biocompatible en solution par l'ajout d'une quantité d'agent réticulant,
 - 5 de réaction de réticulation de ladite quantité de polymère,
 - d'ajout d'une quantité supplémentaire de polymère de masse moléculaire supérieure à 500 000 Da en solution avec dilution du mélange réactionnel du mélange réactionnel de manière à diminuer la concentration globale du polymère en
 - 10 solution, et de réticulation, et

d'arrêt de la réaction de réticulation par élimination de l'agent réticulant.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape d'amorçage de la réticulation est réalisée en milieu basique.
3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape d'amorçage
15 de la réticulation est réalisée en milieu acide.,
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'une quantité supplémentaire d'agent réticulant est ajoutée lors de l'étape d'ajout d'une quantité supplémentaire de polymère.
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'étape
20 d'arrêt de la réticulation est réalisée par dialyse.
6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les polymères sont d'origine naturelle.
7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que les polymères d'origine naturelle sont des composés choisis dans le groupe constitué par : l'acide
25 hyaluronique, la chondroïtine sulfate, le kératane, le kératane sulfate, l'héparine, l'héparane sulfate, la cellulose et ses dérivés, les alginates, le xanthane, la carraghénine, les protéines ou les acides nucléiques.
8. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'au moins un polymère d'origine naturelle est un polymère non naturellement présent chez l'être

humain choisi dans le groupe constitué par : la cellulose et ses dérivés, les alginates, le xanthane, la carraghénine, polymère qui est réticulé avec au moins un polymère naturellement présent chez l'être humain choisi dans le groupe constitué par : l'acide hyaluronique, la chondroïtine sulfate, le kératane, le kératane sulfate, l'héparine, 5 l'héparane sulfate, les protéines ou les acides nucléiques.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'agent réticulant est une molécule bi- ou poly-fonctionnelle sélectionnée parmi les composants du groupe constitué par les époxydes, les épihalohydrines et la divinylsulfone.

10 10. Gel préparé par le procédé selon l'une des revendications 1 à 9.

11. Gel selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il constitue un gel comportant au moins un principe actif dispersé.

12. Utilisation du gel selon la revendication 10 ou 11, pour séparer, remplacer ou combler un tissu biologique ou augmenter le volume dudit tissu ou encore 15 supplémenter ou remplacer un fluide biologique.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/000197

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7	C08J3/24	C08J3/075	A61L27/52	A61L27/26
//C08L5:00				

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/06350 A (PIRON ESTELLE ; THOLIN RAYMONDE (FR); D ESTHETIQUE APPLIQUEE LAB (FR)) 24 January 2002 (2002-01-24) page 1, line 4 - line 29 page 3, line 16 - page 4, line 11 page 6, line 18 - line 22	1-12
A	WO 97/04012 A (AAGERUP BENGT) 6 February 1997 (1997-02-06) claims	1-12
A	WO 96/33751 A (DEBACKER YVES ; JALLET VALERIE (FR); VILLAIN FRANCK (FR); W K ET ASSOC) 31 October 1996 (1996-10-31) the whole document	1-12
A	EP 0 161 887 A (SEIKAGAKU KOGYO CO-LTD) 21 November 1985 (1985-11-21)	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

13 July 2005

11/08/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mazet, J-F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR2005/000197

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0206350	A 24-01-2002	FR 2811996 A1 CA 2416504 A1 EP 1303542 A1 WO 0206350 A1 US 2003148995 A1	25-01-2002 24-01-2002 23-04-2003 24-01-2002 07-08-2003
WO 9704012	A 06-02-1997	US 5827937 A AT 204000 T AU 700215 B2 AU 6371896 A BR 9609534 A CA 2226488 A1 CN 1190974 A ,C CZ 9800129 A3 DE 69614391 D1 DE 69614391 T2 DE 839159 T1 DK 839159 T3 EA 980133 A1 EP 0839159 A1 ES 2161368 T3 GR 3037065 T3 HU 9901714 A2 JP 11509256 T JP 3094074 B2 NO 980213 A NZ 312229 A PL 324608 A1 PT 839159 T WO 9704012 A1 SI 839159 T1 SK 6198 A3 TR 9800072 T1	27-10-1998 15-08-2001 24-12-1998 18-02-1997 23-02-1999 06-02-1997 19-08-1998 17-06-1998 13-09-2001 14-02-2002 07-10-1999 08-10-2001 29-10-1998 06-05-1998 01-12-2001 31-01-2002 28-09-1999 17-08-1999 03-10-2000 16-03-1998 25-11-1998 08-06-1998 30-11-2001 06-02-1997 30-04-2002 11-01-1999 21-05-1998
WO 9633751	A 31-10-1996	FR 2733426 A1 AU 5766796 A WO 9633751 A1 FR 2733427 A1	31-10-1996 18-11-1996 31-10-1996 31-10-1996
EP 0161887	A 21-11-1985	JP 61164558 A JP 1904613 C JP 6034814 B JP 61168362 A JP 1886932 C JP 6011694 B JP 61172808 A JP 1852427 C JP 5074571 B JP 61210034 A JP 2501551 B2 JP 60233101 A DE 3578961 D1 DE 3583963 D1 EP 0161887 A2 EP 0167363 A2 US 4716224 A US 4863907 A	25-07-1986 08-02-1995 11-05-1994 30-07-1986 22-11-1994 16-02-1994 04-08-1986 21-06-1994 18-10-1993 18-09-1986 29-05-1996 19-11-1985 06-09-1990 10-10-1991 21-11-1985 08-01-1986 29-12-1987 05-09-1989

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR2005/000197

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C08J3/24 C08J3/075 A61L27/52 A61L27/26
//C08L5:00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C08J

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 02/06350 A (PIRON ESTELLE ; THOLIN RAYMONDE (FR); D ESTHETIQUE APPLIQUEE LAB (FR)) 24 janvier 2002 (2002-01-24) page 1, ligne 4 - ligne 29 page 3, ligne 16 - page 4, ligne 11 page 6, ligne 18 - ligne 22	1-12
A	WO 97/04012 A (AAGERUP BENGT) 6 février 1997 (1997-02-06) revendications	1-12
A	WO 96/33751 A (DEBACKER YVES ; JALLET VALERIE (FR); VILLAIN FRANCK (FR); W K ET ASSOC) 31 octobre 1996 (1996-10-31) 1e document en entier	1-12
A	EP 0 161 887 A (SEIKAGAKU KOGYO CO LTD) 21 novembre 1985 (1985-11-21)	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée=	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
13 juillet 2005	11/08/2005
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Mazet, J-F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs

membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR2005/000197

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0206350	A	24-01-2002	FR 2811996 A1 CA 2416504 A1 EP 1303542 A1 WO 0206350 A1 US 2003148995 A1	25-01-2002 24-01-2002 23-04-2003 24-01-2002 07-08-2003
WO 9704012	A	06-02-1997	US 5827937 A AT 204000 T AU 700215 B2 AU 6371896 A BR 9609534 A CA 2226488 A1 CN 1190974 A ,C CZ 9800129 A3 DE 69614391 D1 DE 69614391 T2 DE 839159 T1 DK 839159 T3 EA 980133 A1 EP 0839159 A1 ES 2161368 T3 GR 3037065 T3 HU 9901714 A2 JP 11509256 T JP 3094074 B2 NO 980213 A NZ 312229 A PL 324608 A1 PT 839159 T WO 9704012 A1 SI 839159 T1 SK 6198 A3 TR 9800072 T1	27-10-1998 15-08-2001 24-12-1998 18-02-1997 23-02-1999 06-02-1997 19-08-1998 17-06-1998 13-09-2001 14-02-2002 07-10-1999 08-10-2001 29-10-1998 06-05-1998 01-12-2001 31-01-2002 28-09-1999 17-08-1999 03-10-2000 16-03-1998 25-11-1998 08-06-1998 30-11-2001 06-02-1997 30-04-2002 11-01-1999 21-05-1998
WO 9633751	A	31-10-1996	FR 2733426 A1 AU 5766796 A WO 9633751 A1 FR 2733427 A1	31-10-1996 18-11-1996 31-10-1996 31-10-1996
EP 0161887	A	21-11-1985	JP 61164558 A JP 1904613 C JP 6034814 B JP 61168362 A JP 1886932 C JP 6011694 B JP 61172808 A JP 1852427 C JP 5074571 B JP 61210034 A JP 2501551 B2 JP 60233101 A DE 3578961 D1 DE 3583963 D1 EP 0161887 A2 EP 0167363 A2 US 4716224 A US 4863907 A	25-07-1986 08-02-1995 11-05-1994 30-07-1986 22-11-1994 16-02-1994 04-08-1986 21-06-1994 18-10-1993 18-09-1986 29-05-1996 19-11-1985 06-09-1990 10-10-1991 21-11-1985 08-01-1986 29-12-1987 05-09-1989